

**THIS PAGE IS INSERTED BY OIPE SCANNING
AND IS NOT PART OF THE OFFICIAL RECORD**

Best Available Images

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS

TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT

BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED PHOTOS HAVE BEEN RENDERED INTO BLACK AND WHITE

VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS

UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE THE BEST AVAILABLE
COPY. AS RESCANNING *WILL NOT*
CORRECT IMAGES, PLEASE DO NOT
REPORT THE IMAGES TO THE
PROBLEM IMAGE BOX.**



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 12.12.80 (21) 3217609/28-13

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 23.11.82. Бюллетень № 43

Дата опубликования описания 25.11.82

(11) 975797

(51) М. Кл.³

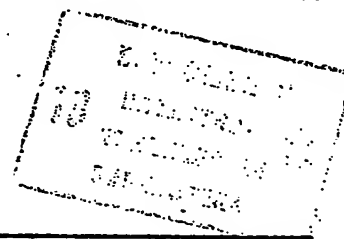
С 12 Н 9/48

(53) УДК 577.15.
.07(088.8)

(72) Авторы
изобретения

М.П. Путере и И.А. Вина

(71) Заявитель



(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ ИЗ ASPERGILLUS ORYZAE

Изобретение относится к способам получения фермента лейцинаминопептидазы (К.Ф.3.4.11.1.), применяемой в молекулярной биологии для исследования аминокислотной последовательности в белковых молекулах, для получения аминокислот и в медицине.

Известны способы получения лейцинаминопептидазы из животного и растительного сырья, например, из почки свиньи [1] и из семян гороха [2].

Однако эти способы основаны на использовании дефицитного или пищевого сырья и не имеют промышленного значения.

Наиболее близким по технической сущности является способ получения лейцинаминопептидазы с помощью микроорганизмов, в частности из плесневого гриба *Aspergillus oryzae* [3].

Способ заключается в том, что неочищенный ферментный раствор предвари-

2
тельно очищают групповой обработкой амберлитом, фракционируют сульфатом аммония, осаждают риванолом. Полученный осадок двукратно экстрагируют 0,5 М ацетатным буфером с pH 5,0. В охлажденном экстракте осаждают белки, добавляя охлажденный ацетон до 67%-ной концентрации. Осадок растворяют в воде. Последующую ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе проводят при линейном градиенте 0-0,4 М NaCl в 0,01 М фосфатном буфере с pH 7,0. После концентрирования на ультрафильтре лейцинаминопептидазную фракцию наносят на колонку с сефадексом G-100 и повторно гельфильтруют на колонке с сефадексом G-200 в 0,1 М ацетатном буфере с pH 6,5. Потом проводят хроматографию на диэтиламиноэтил-сефадексе A-50 с фосфатным буфером (pH 7,0) при линейном градиенте 0-0,4 М NaCl. Очистку завершают повторной гельфильтрацией на сефадексе G-200 в 0,1 М ацетатном буфере с pH 6,5.

Полученный препарат замораживают до -15°C .

Общая активность лейцинаминопептидазы (в экстракте - 2090 ед., в полученном препарате - 262 ед.) - 13%.

Удельная активность лейцинаминопептидазы в экстракте - 0,181 ед./мг белка, в полученном препарате - 4,54 ед./мг белка (субстрат трипептид Лей-Гли-Гли). Вычисленная степень очистки - 25.

Наряду с обеспечением высокой удельной активности известный способ имеет недостатки - сравнительно низкий выход по общей активности, вызванный длительным и многоступенчатым процессом выделения, в котором возникают потери, и недостаточно высокую степень очистки.

Цель изобретения - повышение выхода и степени очистки, упрощение процесса выделения.

Поставленная цель достигается способом получения лейцинаминопептидазы из *Aspergillus oryzae*, включающим экстракцию фермента буфером, осаждение его органическим растворителем с последующей хроматографией на диэтиламиноэтилцеллюлозе с элюцией буфером, содержащим NaCl , причем в качестве органического растворителя при осаждении используют этанол при концентрации 60-67%, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе проводят дважды, при этом сорбцию фермента проводят в статических условиях при объемном соотношении фермент:сорбент 1:(1,3-1,5), элюцию фермента осуществляют в динамических условиях ступенчатым градиентом NaCl от 0,2 до 0,5 М в буфере, а между хроматографическими стадиями ферментсодержащий раствор подвергают термообработке при 60-62 $^{\circ}\text{C}$ в течение 10-12 мин.

Обычно используют 0,005 М верональный буфер с pH 7,9-8,0.

Этим достигается повышение качества сорбции фермента на ионообменной целлюлозе, которую осуществляют смешиванием ферментного раствора с сорбентом в статических условиях. Проведением десорбции фермента в динамических условиях при ступенчатом градиенте достигается четкость разделения белков. Отличия в условиях сорбции и десорбции сокращают время проведения стадий ионообменной хроматографии и рехроматографии. Увеличение

степени очистки на этих стадиях позволяет отказаться от гельфильтрации на сефадексе и упростить процесс.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

Амилоризин П 10 X экстрагируют 3 ч 0,005 М верональным буфером с pH 7,9-8,1 при комнатной температуре. Центрифугируют 25-35 мин при 5500-6000 об/мин. Центрифугат охлаждают и добавляют охлажденный до -20°C этиловый спирт до конечной концентрации 60-67%. Через 20 мин осадок отделяют центрифугированием, которое осуществляют 20-25 мин при 5500-6000 об/мин и 0-4 $^{\circ}\text{C}$, и растворяют в двойном объеме 0,005 М веронального буфера с pH 7,9-8,1. Нерастворенный осадок отделяют центрифугированием при тех же условиях. Полученный центрифугат смешивают с уравновешенной буфером ДЭАЭ-целлюлозой в объемных соотношениях 1:(1,3-1,5) и заполняют колонку. Несорбированные белки и лейцинаминопептидаzoneактивные белки отмывают 0,2 М раствором NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1. Активную фракцию десорбируют 0,5 М раствором NaCl в том же буфере, диализируют и нагревают до 60-62 $^{\circ}\text{C}$, выдерживают при этой температуре 10-12 мин, быстро охлаждают до 0-4 $^{\circ}\text{C}$, смешивают с уравновешенной буфером ДЭАЭ-целлюлозой в объемных соотношениях 1:(1,3-1,5) и заполняют в колонку. Отмывание колонки и десорбцию фермента проводят как и первую хроматографию. Полученный препарат концентрируют с сухим сефадексом G-75.

Выход по активности - 25% (активность в экстракте - 8,68 ед., в полученном препарате - 2,17 ед.).

Степень очистки - 38 (удельная активность экстракта - 0,00815, полученного препарата - 0,31 ед./мг белка по субстрату Лей-И-нитроанилид).

Пример 1. 50 г амилоризина П 10 X экстрагируют в 250 мл 0,005 М веронального буфера с pH 7,9-8,1 в течение 3 ч при комнатной температуре. Центрифугируют 25-35 мин при 5,5-6,0 тыс.об/мин.

Экстракт (215 мл) охлаждают до 0-4 $^{\circ}\text{C}$ и добавляют 502 мл 96%-ного этилового спирта, охлажденного до -20°C , до конечной концентрации 67%. Через 20 мин осадок отделяют центри-

фугировании при 5,5-6,0 тыс.об/мин при (-2) - (2)°С и растворяют в 100 мл 0,005 М веронального буфера с pH 7,9-8,1. Нерастворимый осадок отделяют центрифугированием при тех же условиях.

Полученные 135 мл центрифугата смешивают в течение часа с 175 мл уравновешенной буфером ДЭАЗ-целлюлозой (в объемных соотношениях 1:1,3) и за-10 полняют в хроматографическую колонку. Несорбированные и балластные белки отмывают двумя литрами 0,2 М раствора NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1. Активную фракцию десорбируют, пропуская через колонку 1 л 0,5 М раствора NaCl в том же буфере. Первые 20 мл элюата выбрасывают (не имеют лейцинаминопептидазной активности), следующие 320 мл, содер-20 жающие максимально активный фермент, собирают и диализируют против 5 л 0,0005 М веронального буфера с pH 7,9-8,1 в течение 24 ч. Во время диализа буферный раствор меняют 4 раза.

Диализированный раствор нагревают до 60-62°С и выдерживают при этой температуре 10 мин, потом быстро охлаждают до 2-6°С.

Инактивированные протеиназы отделяют с помощью рехроматографии на ионообменной целлюлозе. Диализированный ферментный раствор смешивают в течение часа с уравновешенной буфером ДЭАЗ-целлюлозой в объемных соотношениях 1:1,3 и заполняют в хроматографическую колонку. Несорбированные белки отмывают двумя литрами 0,2 М раствора NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1. Активную фракцию десорбируют одним литром 0,5 М раствора NaCl в том же буфере. Первые 20 мл элюата выбрасывают (не имеют лейцинаминопептидазной активности), следующие 320 мл, содержащие максимально активный фермент, собирают и диализируют против 5 л 0,0005 М веронального буфера с pH 7,9-8,1 в течение 24 ч. Во время диализа буферный раствор меняют 4 раза.

С целью концентрирования в 350 мл диализированного ферментного раствора помещают целлофановый мешочек с 40 г сухого себадекса G-75. Через 24 ч к 5 мл концентрированного ферментного раствора прибавляют 2,36 г сухого сульфата аммония (до 39% от 0,7 насыщения) и 0,0012 хлористого магния.

Общий выход по активности полученного препарата - 25% (активность экстракта - 8,84 ед., полученного препарата - 2,21 ед.). Степень очистки - 32 (удельная активность экстракта - 0,0079, полученного препарата - 0,25 ед./мг белка по субстрату Лей-п-нитроанилид).

Пример 2. 50 г амилоризина п 10 X экстрагируют в 250 мл 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1 в течение 3 ч при комнатной температуре. Центрифугируют, осаждают белки спиртом, центрифугируют, растворяют осадок и вновь центрифугируют, как в примере 1.

Полученные 130 мл центрифугата смешивают в течение часа с 195 мл уравновешенной буфером ДЭАЗ-целлюлозой (в объемных соотношениях 1:1,5) и заполняют хроматографическую колонку. Несорбированные и балластные белки отмывают двумя литрами 0,2 М раствора NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1. Активную ферментную фракцию десорбируют, пропуская через колонку 1 л 0,4 М раствора NaCl в том же буфере. Первые 30 мл элюата выбрасывают (не имеют лейцинаминопептидазной активности), следующие 340 мл, содержащие максимально активный фермент, собирают. Диализ и тепловую обработку проводят аналогично первому примеру.

При рехроматографии диализированный ферментный раствор смешивают в течение часа с уравновешенной буфером ДЭАЗ-целлюлозой (в объемных соотношениях 1:1,5) и заполняют хроматографическую колонку. Несорбированные и балластные белки отмывают двумя литрами 0,2 М раствора NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1. Активную фракцию десорбируют одним литром 0,4 М раствором NaCl в том же буфере. Первые 30 мл элюата выбрасывают (не имеют лейцинаминопептидазной активности), следующие 330 мл, содержащие максимально активный фермент, собирают. Диализ и концентрирование конечного продукта проводят аналогично первому примеру.

Общий выход по активности полученного продукта - 25% (активность экстракта - 8,91 ед., полученного препарата - 2,23 ед.). Степень очистки - 34 (удельная активность экстракта - 0,0093, полученного препарата -

0,30 ед./мг белка по субстрату Лей-И-нитроанилид).

П р и м е р 3. Экстракцию и осаждение белков этанолом проводят аналогично первому примеру. При ионообменной хроматографии 130 мл ферментного раствора смешивают в течение часа с 180 мл уравновешенной буфером ДЭАЭ-целлюлозой (в объемных соотношениях 1:1,4) и заполняют хроматографическую колонку. Несорбированные и балластные белки отмывают двумя литрами 0,3 М раствора NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1. Ферментную фракцию десорбируют, пропуская через колонку 1 л 0,4 М раствора NaCl в том же буфере. Первые 30 мл элюата выбрасывают (не имеют лейцинаминопептидазной активности), следующие 330 мл элюата, содержащие максимально активный фермент, собирают. Диализ и термоинактивацию балластных белков проводят аналогично первому примеру. При рехроматографии диализированный ферментный раствор смешивают в течение часа с уравновешенной буфером ДЭАЭ-целлюлозой (в объемных соотношениях 1:1,4), заполняют колонку, отмывают 0,3 М раствором NaCl в 0,005 М верональном буфере с pH 7,9-8,1 и десорбируют 0,4 М раствором NaCl в том же буфере. Собирают 330 мл (с 31-го по 360-ый мл) элюата, содержащих максимально активный фермент. Конечный продукт получают после диализа и концентрирования.

Общий выход по активности конечного продукта - 25% (активность экстракта - 8,77 ед., полученного препарата - 2,79 ед.). Степень очистки - 38 (удельная активность экстракта - 0,00815, полученного препарата - 0,31 ед./мг белка по субстрату Лей-И-нитроанилид).

Определение активности фермента.

За единицу активности лейцинаминопептидазы принимают такое количество фермента, которое гидролизует 1,0 мкмоль лейцин-И-нитроанилида в минуту при 37°C и pH 8,5.

Удельную активность лейцинаминопептидазы вычисляют по формуле

$$A = \frac{D_{400} 3,5}{3,9 \cdot t \cdot 0,1 \cdot x} \text{ ед./мг белка,}$$

где 3,5 - объем реакционной смеси в кювете, см³;

3,9 - коэффициент экстинкции 1 мкмоль И-нитроанилина в условиях опыта;

t - время инкубации фермента с субстратом;

0,1 - объем раствора препарата, взятый на анализ, см³;

x - концентрация белка в исходном растворе, мг/см³ (определяется по Лоури).

Активность лейцинаминопептидазы определена на субстрате Лей-И-нитроанилид отечественного производства.

Технико-экономический эффект изобретения заключается в обеспечении производства фермента лейцинаминопептидазы, используемого в молекулярной биологии и медицине из дешевого микробиального сырья; повышение общего выхода по активности, который по известному способу составляет 13%, а по предлагаемому - 25%. Кроме того, степень очистки увеличивается с 25 (по известному способу) до 38 (по предлагаемому). В процессе выделения исключаются также стадии гельфльтрации на сефадексе G-100 и сефадексе G-200.

Формула изобретения

1. Способ выделения лейцинаминопептидазы из *Aspergillus oryzae* путем экстракции фермента буфером, осаждения его органическим растворителем с последующей хроматографией на диэтиламиноэтилцеллюлозе с элюцией буфером, содержащим NaCl, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода по активности и степени очистки фермента, а также упрощения процесса, в качестве органического растворителя при осаждении используют этанол при концентрации 60-67%, хроматографию на диэтиламиноэтилцеллюлозе проводят дважды, причем сорбцию фермента проводят в статических условиях при объемном соотношении фермент : сорбент 1:(1,3-1,5), элюцию фермента осуществляют в динамических условиях ступенчатым градиентом NaCl от 0,2 до 0,5 М в буфере, а между хроматографическими стадиями фермент-содержащий раствор подвергают термообработке при 60-62°C в течение 10-12 мин.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что используют 0,005 М верональный буфер с pH 7,9-8,1.

Источники информации,
принятые во внимание при экспертизе

1. Spackman D.H., Smith E.L.,
Brown D.U. Leucine aminopeptidase IV. ;
Isolation and properties of the enzyme
from swine Kidney. J. Biol. Chem.,
1955, vol. 212, Nr. 1, p. 255.

2. Elleman T.C. Aminopeptidase of
pea. Biochem. J., 1974, Vol. 141,
Nr. 1, p. 113-118.

3. Nakadai T., Masuno S., Iguchi M.
Purification of leucine aminopeptida-
se II from Asp. oryzae. Agr. Biol.
Chem., 1973, Vol. 37, Nr. 4, p. 767-
774.

Составитель О. Скородумова

Редактор И. Егорова Техред М. Гергель Корректор А. Гриценко
Заказ 8936/43 Тираж 505 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., в. 4/5
Бюллетень ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4